

원발성 폐암에서 p53 암억제유전자 단백질의 발현 양상

동아대학교 의과대학 병리학교실

이 상 용 · 정 진 숙 · 홍 숙 희

Immunohistochemical Study of the Expression of the p53 Protein in Primary Lung Cancer

Sang Yong Lee, M.D., Jin Sook Jeong, M.D. and Sook Hee Hong, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Dong-A University

An immunohistochemical stain for p53 tumor suppressor gene product was performed in 59 primary lung cancers to study the relation between its expression and type of the tumor, degree of tumor differentiation, clinical stage and smoking.

The results were as follows:

1. The expression of mutant p53 protein was noted in 28 of 59 cases(47.5%) of primary lung cancers. The p53 protein was expressed in 21 of 35(60%) squamous cell carcinomas, in 6 of 21(28.6%) adenocarcinomas, and 1 of 1(100%) small cell carcinoma. There was a significant difference in expression of p53 among the different histologic types of lung cancer($p < 0.05$).
2. The incidence of p53 protein expression did not correlate with the degree of tumor cell differentiation or the clinical stage of lung carcinoma($p > 0.05$).
3. The incidence of p53 protein expression was higher in smokers(current: 75%, former: 46.2%) than in non-smokers(5.6%) and was increased in direct proportion to the pack years. There was a statistically significant correlation between p53 expression and smoking($p < 0.05$).

The mutation of p53 gene may often be an early event in the development of lung cancer and it is suggested that the smoking known as a risk factor for the development of the lung cancer may be associated with the transformation of p53 tumor suppressor gene into mutant p53 gene or oncogene. (*Korean J Pathol* 1996; 30: 218~227)

Key Words: Primary lung cancer, p53, Smoking, Immunohistochemical stain

서 론

원발성 폐암은 전세계적으로 암에 의한 사망의 주요한 원인으로 알려져 있으며¹ 임상적으로 매우 급진적 경과를 보이는 악성종양이다. 폐암의 발생 기전은 현재까지도 확실히 밝혀져 있지는 않지만, 흡연 및 여러 환경적인 발암물질 등이 어떠한 생물학적인 변화들을 일으킴으로서 폐암발생에 관여한다고 알려져 있다. 최근에 급속히 발달되고 있는 분자생물학적 기술을 이용한 연구에 의하면, 정상 기관지상피의 악성전환은 체세포의 유전자들의 일련의 변화에 의한 다단계 과정이며, 발암유전자와 종양억제유전자의 변화가 발암과정에 필연적으로 동반된다고 하였다¹⁻³. 이러한 폐암발생과 관련된 암 유전자의 변화중 가장 흔한 것이 종양억제유전자인 p53의 변이인 것으로 알려져 있다⁴⁻⁶.

p53 유전자 산물인 p53 단백질은 53kD의 핵단백질로서 DNA 종양 바이러스인 SV(simian virus) 40의 large T항원에 결합하는 특성으로 인해 처음 발견되었으며⁷, 이의 유전자부호는 17번 염색체의 단암의 13 band에 위치하며⁸, 인체 각종 종양에서 높은 빈도로 유전자 변이나 소실을 보인다⁹⁻¹⁷. 폐암에서 가장 흔하게 발견되는 p53 유전자의 변이 형태는 SV40 large T항원과 결합부위에서 일어난 mis-sense 변이이다. 이때 핵산 염기서열이 구아닌에서 티미딘으로 바뀌게 되는데^{4,5}, 이러한 현상은 담배의 주요 구성 성분인 benzopyrene과 같은 발암물질들에 의해서 잘 발생하는 것으로 알려져 있다¹⁸. 한편 p53 유전자 변이가 폐암에서 관찰되는 가장 흔한 유전자 이상이며 악성으로 발전해 나가는데 중요한 단계이지만, p53 변이 단독으로는 종양을 발생시키기에 충분치 않다는 보고가 있고¹⁰ 또 p53의 이형접합체의 소실이 폐암발생에 연관이 있음이 여러 연구에서 보고되고 있다^{10,19}.

야생형 p53 단백질은 15~20분의 짧은 반감기를 가지며 정상세포에서 매우 소량으로 존재하므로 면역조직화학적 염색법으로는 검출이 안되나 변이형 p53 유전자 단백질은 수시간 정도의 긴 반감기를 가지며, hsp70(a member of heat shock protein family)이라는 세포단백질과 결합함으로써 단백질 구조의 변화가 일어나 안전성이 증가되어 축적되므로^{20,21} 면역조직화학적 염색에서 검출될 정도로 세포 핵내에 변이형 p53 단백질이 존재하게 된다.

본 연구자는 원발성 폐암조직에서 p53 단백질에 대한 면역조직화학적 염색을 실시하여 종양에서

p53 단백질의 발현 양상을 관찰하여 종양의 임상적, 병리학적 특징과 p53 단백질 발현 사이의 상관 관계를 알아 보고자 한다. 또 폐암발생에 있어서 중요한 요인이 되는 흡연습관과 p53 단백질 발현과의 상관 관계를 살펴봄으로서 흡연이 폐암발생 과정에 어떠한 역할을 하는지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

연구 재료로는 1990년 3월부터 1994년 6월까지 동아대학교 병원에서 원발성 폐암으로 진단받고 편측 폐절제술이나 폐엽절제술을 실시받은 59명의 환자들로부터 얻은 폐암 조직을 사용하였다. 이들 환자의 성별, 연령, 흡연의 과거력, TNM 병기 등과 같은 임상자료와 조직학적 분화도, 조직학적 형태 등과 같은 병리학적 소견을 면밀히 재검토하였다. 병기는 American Joint Committee on Cancer의 TNM 병기에 따라 분류하였다²².

2. 면역조직화학적 염색

포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 폐암 조직절편을 먼저 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 WHO 분류에 따른 조직학적 진단을 검색하였고, p53 단백질의 발현정도를 알아보기 위하여 폐암 조직절편을 avidin과 biotin사이의 강한 결합력을 이용한 ABC방법(Avidin-biotinyl peroxidase complex method)으로 면역조직화학적 염색을 실시하였다. p53 단백질에 대한 항체로는 야생형과 변이형 모두에 반응하는 단클론 항체(Ab-6)(Oncogene Science Inc, Cambridge, MA)를 사용하였다.

염색 방법은 우선 파라핀 조직절편을 4 μ m 두께로 잘라서 크실렌에서 파라핀을 제거한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 1분씩 담구어 합수시키고 증류수로 씻어 내었다. 3% 과산화수소를 조직절편위에 떨어뜨려 30분간 실온에 방치하여 내인성 peroxidase를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후, 0.05%의 saponin을 덮어 30분간 실온에 둔 후 PBS로 세척하였다. 1:100으로 희석된 단클론 1차 항체와 실온에서 하루밤 정도 반응시킨 후 PBS로 세척한 뒤, 다시 1:100으로 희석된 biotin과 결합된 2차 항체(Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG)를 실온에서 45분간 반응시키고 난 후 PBS로 씻었다. 1:100으로 희석된 avidin-biotinyl peroxidase complex를 실온에서 30분간 반응시키고 PBS로 씻은 후 발색제

인 AEC를 첨가하였다. Mayer hematoxylin에 3분간 대조염색 후 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경하였다.

3. 염색의 평가

p53 단백질의 핵염색의 강도는 음성(-), 약양성(+), 중등도양성(++) 또는 강양성(+++)으로 등급을 정하였고, 종양세포 중 10% 미만은 양성 반응을 보일 경우는 focal, 10%에서 50% 사이는 regional, 그리고 50% 이상은 diffuse 양상을 보이는 범주에 포함시켰다. 종양조직에서 p53 단백질이 어떠한 양상을 보이든지간에 핵염색의 강도가 강양성인 경우, diffuse 또는 regional한 염색 양상을 보이면서 중등도양성의 강도를 보이는 경우, 그리고 diffuse한 염색 양상을 보이면서 약양성의 강도를 보이는 경우를 높은 수준의 p53 단백질 발현(high-level p53 expression)을 보이는 종양으로 하였고, 이외의 모든 경우는 낮은 수준의 p53 단백질 발현(low-level p53 expression)을 보이는 종양으로 간주하였다.

4. 통계 처리

폐암의 조직학적 형, 분화도 및 병기, 그리고 환자의 흡연 유무 및 흡연 기간, 성별, 연령 등의 임상 자료들과 p53 단백질 발현과의 상관 관계를 알아보기 위해 SAS system(statistical package SAS for windows release 6.08)을 이용하여 비교 분석하였고 p-value가 0.05이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 임상 자료의 분석

본 연구의 대상이 된 59예의 원발성 폐암환자의 임상 정보는 다음과 같다.

폐암환자 59예의 연령분포는 32세부터 80세였으며 평균연령은 55.2세였다. 성별로는 남자가 49예(83.1%)이었고 여자가 10예(16.1%)이었으며, 남녀 모두 50대(44.0%)와 60대(30.7%)에서 높은 발생율을 나타내었다. 흡연의 과거력이 있는 41예의 환자 중에 진단 당시까지도 흡연을 하였던 경우(current)는 28예(남자: 27, 여자: 1), 과거에 담배를 피웠던 경우(former)는 13예(남자: 13, 여자: 0)이었고, 흡연의 과거력이 없는 경우는 18예(남자: 9, 여자: 9)이었다.

2. p53 단백질 발현 빈도 및 발현 양상(Table 1)

p53은 총 59예 중 28예(47.5%)에서 양성을 보였으

Table 1. Patterns and intensities of p53 immunohistochemical staining in 28 p53-positive cases

Nuclear intensity	p53 staining pattern		
	Focal (<10%)	Regional (10~50%)	Diffuse (>50%)
Strong	0(0.0%) ^a	1(1.7%) ^a	8(13.6%) ^a
Moderate	0(0.0%) ^b	3(5.1%) ^a	13(22.0%) ^a
Weak	1(1.7%) ^b	0(0.0%) ^b	2(3.4%) ^a

a: High-level p53 expression; 27 cases

b: Low-level p53 expression; 1 cases

Table 2. Relationship between p53 expression and histologic types

Histologic type	Number of cases(%)	p53-positive cases(%)
SCC	35(59.3)	21(60.0)
Adeno	21(35.6)	6(28.6)
AdenoSCC	1(1.7)	0(0.0)
Small	1(1.7)	1(100.0)
U-Large	1(1.7)	0(0.0)
Total	59(100.0)	28(47.5)

(p=0.01, Mantel-Haenszel chi-square)

SCC; Squamous Cell carcinoma, Adeno; Adenocarcinoma,

AdenoSCC; Adenosquamous carcinoma,

Small; Small Cell carcinoma,

U-Large; Undifferentiated Large cell Carcinoma

며, 28예의 p53 양성 종양 중에서 27예(45.8%)가 높은 수준의 p53 단백질 발현을 보였고, 나머지 1예(1.7%)는 낮은 수준의 p53 단백질 발현을 보였다. 나이(p=0.087)와 성별(p=0.059)에 따른 발현을 차이는 없었다.

3. 조직학적 분류에 따른 p53 단백질 발현(Table 2)

편평세포암 35예 중 21예(60.0%), 선암 21예 중 6예(28.6%), 소세포암 1예 중 1예(100%)가 p53 단백질 양성을 보인 반면, 미분화성 대세포암 1예, 편평상피선암 1예는 모두 음성을 보였다. 편평세포암에서 선암보다 높은 빈도의 p53 단백질 발현율을 보여

폐암의 조직학적 형, 특히 편평세포암과 선암에서 p53의 발현 빈도에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다(p=0.01). 편평상피암과 선암주위의 정상 폐조직에서는 p53 단백질 발현을 볼 수 없었다(Fig. 3, 4,

5).

4. 조직학적 분화도에 따른 p53 단백질 발현
(Table 3와 4)

폐암의 조직학적 분화도에 따른 p53 발현을 보면,

Table 3. Relationship between p53 expression and histologic grade of 35 squamous cell carcinomas of the lung

p53	Histologic grade			Total
	Well diff*	Mod** diff.	Poorly diff.	
Positive	6(28.6%)	11(52.4%)	4(19.1%)	21(60%)
Negative	6(42.9%)	4(28.6%)	4(28.6%)	14(40%)

*diff; differentiated, **Mod; moderately
Distributions are equal(p=0.213, Mantel-Haenszel chi-square)

Table 4. Relationship between p53 expression and histologic grade of 21 adenocarcinomas of the lung

p53	Histologic grade			Total
	Well diff*	Mod** diff.	Poorly diff.	
Positive	5(83.3%)	0(0.0%)	1(16.7%)	6(28.6%)
Negative	7(46.7%)	2(13.3%)	6(40.0%)	15(71.4%)

*diff; differentiated, **Mod; moderately
Distributions are equal(p=0.102, Mantel-Haenszel chi-square)

Table 5. Relationship between p53 expression and tumor stage

p53	Tumor stage		Total
	I-II stages	III-IV stages	
Positive	15(53.6%)	13(46.4%)	28(47.5%)
Negative	17(54.8%)	14(45.2%)	31(52.5%)

(p=0.18, Mantel-Haenszel chi-square)

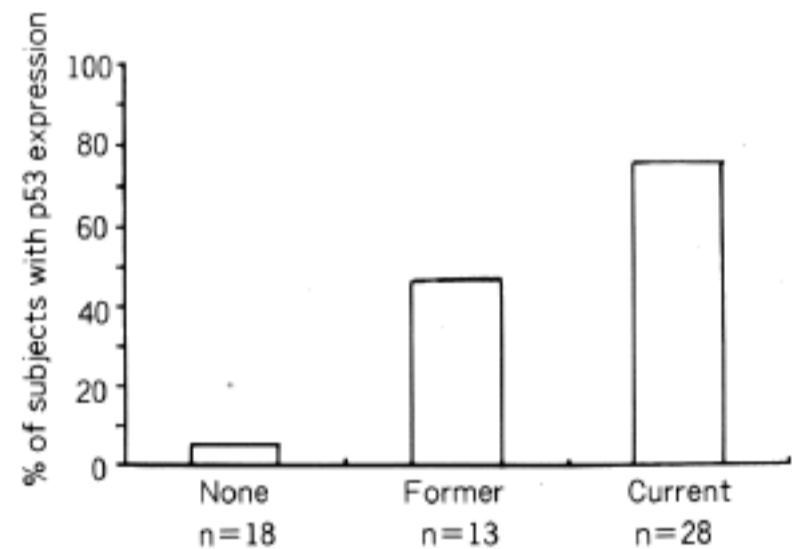


Fig. 1. Relation of p53 expression with cigarette smoking habits(p=0.0001, chi-square).

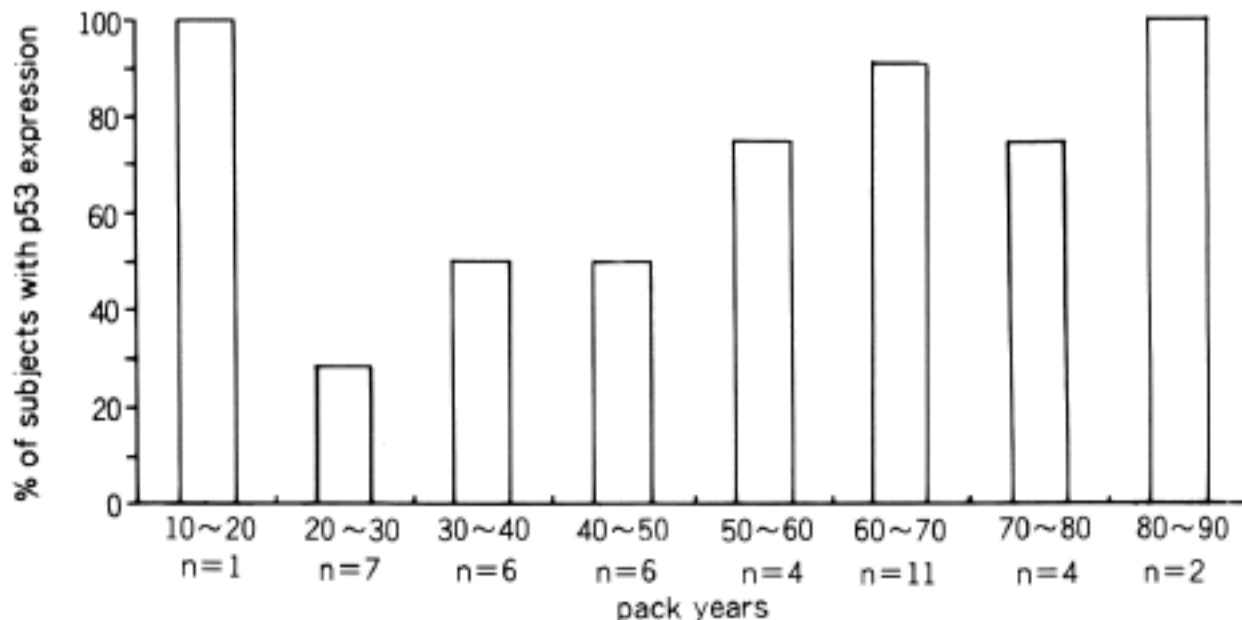


Fig. 2. Correlation of p53 expression with the pack years of patients(p=0.01, Mantel-Haenszel chi-square).

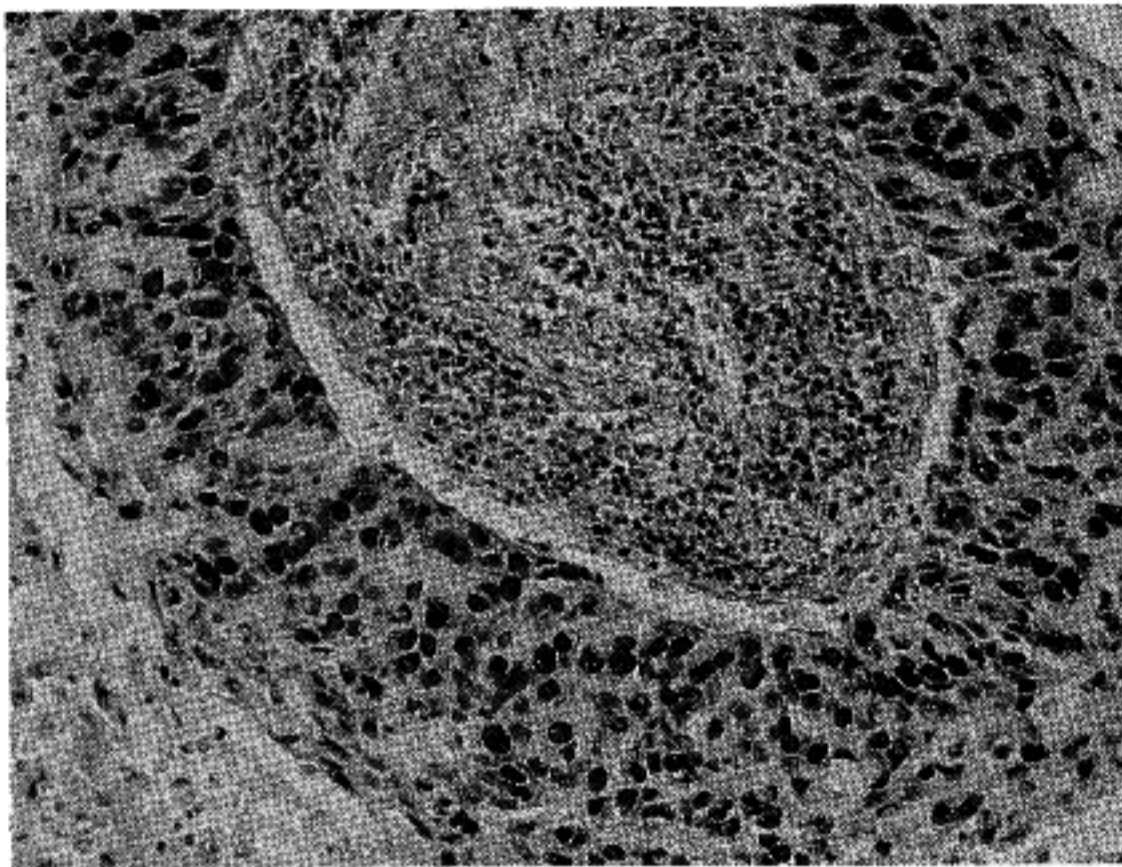


Fig. 3. The squamous cell carcinoma of the lung shows strong and diffuse nuclear staining for p53 protein.

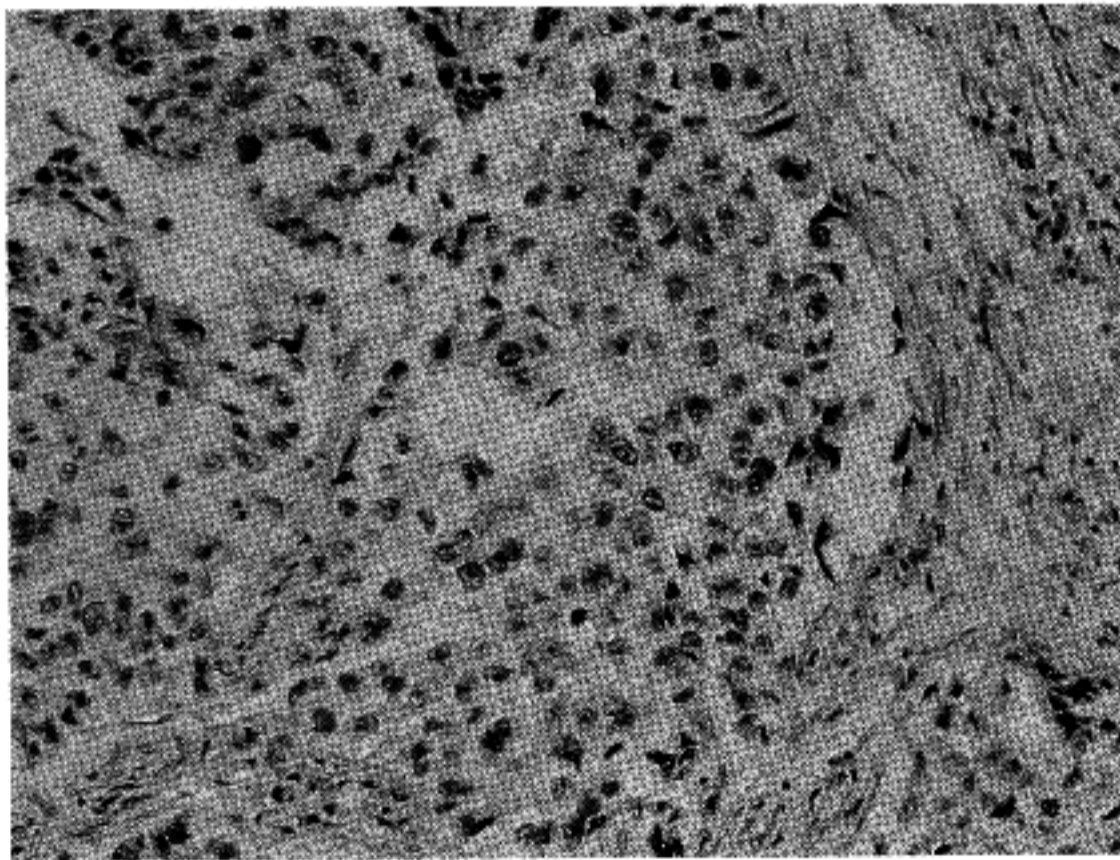


Fig. 4. The squamous cell carcinoma of the lung shows moderate and diffuse nuclear staining for p53 protein.

35예의 편평세포암 중에서 분화도가 좋은 12예 중 6예(28.6%), 중등도인 15예 중 11예(52.4%) 그리고 나쁜 8예 중 4예(19.0%)에서 p53 단백질 발현을 보여 편평세포암의 조직학적 분화도에 따른 p53의 발현 빈도사이에 통계적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았다($p=0.213$)(Table 4). 21예의 선암 중 분화

도가 좋은 11예 중 5예(83.3%), 중등도인 2예 중 0예(0%), 그리고 나쁜 7예 중 1예(16.7%)에서 p53 단백질 발현을 보여 선암의 조직학적 분화도와 p53의 발현 빈도사이에 통계적으로 유의한 상관 관계는 없었다($p=0.102$)(Table 5).

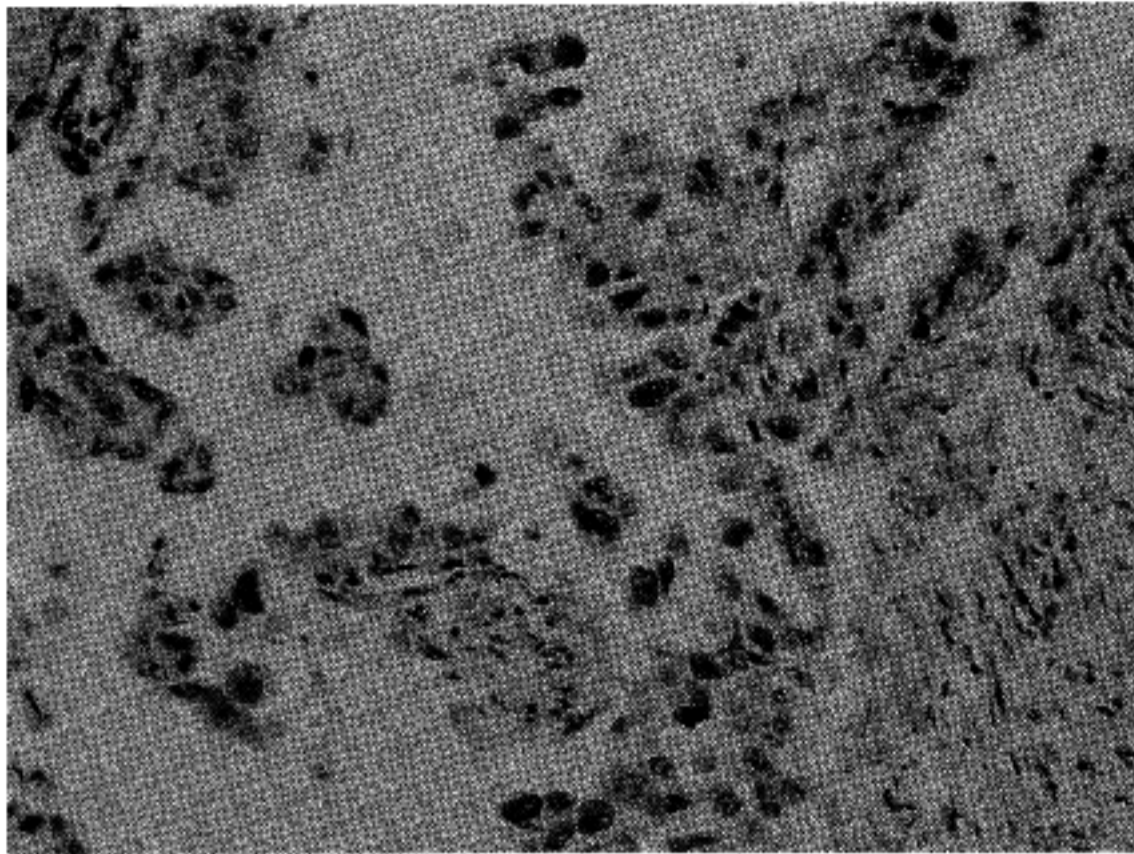


Fig. 5. The adenocarcinoma of the lung shows moderate and regional nuclear staining for p53 protein.

5. 폐암의 병기에 따른 p53 단백질 발현(Table 5)

폐암의 병기를 I기와 II기를 초기군으로, III기와 IV기를 진행군으로 나누어 폐암의 병기에 따른 p53의 발현을 관찰하였는데, 병기가 I기 또는 II기인 32예 중 15예(47%), III기 또는 IV기인 27예 중 13예(45%)에서 p53 단백질 발현을 보였지만, 두 군 사이에 p53 단백질 발현의 빈도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.18$).

6. 흡연과 p53 단백질 발현과의 상관 관계 (Fig. 1, 2)

대상군 59명 중에서 폐암 진단 당시까지도 담배를 피웠던 28예(남자: 27, 여자: 1) 중 21예(75%), 이전에 담배를 피웠던 13예(남자: 13, 여자: 0) 중 6예(46.2%), 그리고 담배를 피운 적이 없는 18예(남자: 9, 여자: 9) 중에서 1예(5.6%)에서 p53 단백질 발현이 나타나 p53 단백질 발현 빈도는 흡연의 경력이 있는 사람에서 흡연 경험이 전혀 없는 사람보다 훨씬 높았는데, 이는 통계학적으로 유의한 차이가 있음을 보였다($p=0.0001$)(Fig. 1). 그리고 pack years(packs of cigarettes per day x year smoked)에 따른 p53 단백질 발현 빈도를 보면, 10년에서 20년사이의 1예 중에서 1예(100%), 20년에서 30년사이의 7예 중 2예(28.6%), 30년에서 40년사이의 6예 중 3예(50%), 40년에서 50년사이의 6예 중 3예(50%), 50년에서 60년사이의 4

예 중 3예(75%), 60년에서 70년사이의 11예 중 10예(90.9%), 70년에서 80년사이의 4예 중 3예(75%), 80년 이상의 2예 중 2예(100%)에서 p53 발현을 보여 흡연 기간이 길수록 p53 단백질 발현율이 높아지는 현상이 관찰되었는데, pack years와 p53 단백질 발현 빈도 사이에는 통계적으로도 유의한 상관 관계가 있음을 보였다($p=0.01$)(Fig. 2).

고 찰

원발성 폐암은 우리나라에서도 암에 의한 사망의 중요한 원인으로 되고 있다. 비록 흡연이 폐암을 유발하는데 있어서 가장 중요한 위험인자로 알려져 있지만 아직까지도 정상 기도세포가 악성세포로 전환되는 분자학적 변화 및 기전은 완전히 밝혀져 있지 않은 상태이다. 인체에 발생하는 여러 암의 발생 과정의 연구에서 최근에 p53 유전자의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 유전자는 암억제유전자로서 이 유전자가 만든 단백질은 DNA와 결합하여 전사를 조절함으로써 세포성장을 조절한다^{23,24}. 정상적인 야생형의 p53 단백질은 DNA 손상이 일어났을 때는 DNA의 복구가 완료될 때까지 세포분열 주기중 DNA의 합성단계인 S-단계로의 진입을 지연시키는 반면, 변이형의 p53 단백질은 이러한 기능이 없으므로 DNA의 복구가 완료되기 전에 S-단계로의 진입이 일어나고 세포분열이 진행되어 세포의 성장

과 증식에 이상을 가져온다.

최근 p53 단백질을 생성하는 유전자의 변화가 원발성 폐암의 각 조직학적 형에서 발견되고^{4,5,25}, 정상 폐조직에서는 p53 단백질이 전혀 발현되지 않는 것으로 보아 분명히 p53 단백질의 과다 발현은 폐암의 발생과 연관이 있음을 시사해 준다. 폐 이외의 대장, 직장^{9,11}, 갑상선¹², 유방¹³, 자궁 내막¹⁴, 경막¹⁵, 전립선¹⁶, 식도¹⁷ 그리고 난소¹⁰ 등 인체의 여러 장기에 발생한 암종에서도 p53 유전자의 변이가 빈번히 관찰되고 있어 p53이 인체암에서 가장 흔히 관찰되는 암유전자로 알려져 있다. 본 연구에서는 59예의 원발성 폐암조직에서 28예(47.5%)에서 변이 p53 단백질의 발현이 관찰되었다. p53 유전자의 변이 중 암을 유발하는데 있어서 가장 중요하고 대부분을 차지하는 것은 mis-sense 변이인데^{24,26}, 이 때 염기 서열중 구아닌이 티미딘으로 대체되면서 변이 p53 단백질이 만들어지는 것이다^{4,5}. 이러한 유전자 변이로 인해 세포증식에 이상이 일어나는 것이 종양발생에 가장 중요한 것이지만, 유전자 변이 단독만으로는 불가능하며 두번째로 흔하고 중요한 변화는 염색체 17번의 단암의 13 band의 이형접합체의 소실로서 p53 변이와 함께 p53 기능소실이 추가되어 세포의 성장과 증식에 변화가 생기게 된다^{10,19}. p53 유전자 변이에 의한 p53 단백질의 구조적 변화는 이 단백질의 안정성을 증가시켜 면역조직화학적 염색 방법으로 검출될 정도로 충분한 양의 p53 단백질이 핵내에 축적된다.

본 연구에서 p53 단백질의 발현 양상을 높은 수준과 낮은 수준의 경우 두가지의 범주로 나누어 관찰하였는데, 이렇게 나누는 것은 염색되는 세포의 비율과 염색의 강도가 p53 유전자의 변이와 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있기 때문이다. 즉 높은 수준의 p53 단백질 발현은 p53 유전자의 exon 5에서 8위치에서의 mis-sense 변이에 의한 현상이고, 낮은 수준의 p53 단백질 발현은 같은 위치에서의 mis-sense 변이 외의 다른 형태의 p53 유전자의 변이들과 야생형의 p53 유전자에 의해 발견되는 단백질인 것으로 알려져 있다²⁷. 이러한 유전자들에 의해 만들어진 p53 단백질은 면역조직화학적 염색에서 다양하게 나타나지만, 종양과의 연관성을 평가하는데는 높은 수준의 p53 단백질 발현이 중요하다. 이러한 사실은 폐암에서 가장 흔한 형태의 p53 유전자 변이에 의해 발견되는 p53 단백질이 강양성으로 미만성으로 염색되고²⁷, 또한 유방암, 전립선암에서는 낮은 수준의 p53 단백질 발현보다는 높은 수준의 p53 단백질 발현을 보이는 종양이 좋지 못한 예

후를 보인다는 보고를 통해 증명되고 있다^{13,16}. 본 연구에서 p53 단백질 발현을 보이는 28예중 27예가 높은 수준의 p53 단백질 발현을 보여 이것이 종양과 관련된 p53 단백질이라는 것을 시사하였다(Table 1).

본 연구에서 59예의 포르말린에 고정된 원발성 폐암조직 중에서 28예(47.5%)에서 p53 단백질 발현이 관찰되었는데 이 결과는 Iggo등⁴이 신선 동결된 편평세포암, 선암과 소세포암조직의 66%에서 p53 단백질의 발현을 관찰한 것에 비하면 검출율이 낮는데 그 이유는 다음과 같은 몇가지 이유로 인한 것으로 생각된다. 신선 동결조직과 포르말린 고정조직에서의 p53 단백질의 검출 빈도는 차이를 보이지 아니하였다는 보고가 있어^{12,28} 본 연구에서 포르말린에 고정된 조직을 사용하였다고 하여 생긴 차이는 아니라고 생각되며, 아마도 본 연구의 대상이 된 59명의 환자 중 비흡연자와 이전에 흡연의 과거력을 가지고 있었던 환자가 31명(53%)(Fig. 1)으로 비교적 많이 포함되었기 때문이 아닐까 생각된다. 그러나 포르말린에 고정된 70예의 폐선암 조직을 대상으로 한 Westra등¹의 연구에 의하면 환자군 중에서 비흡연자와 이전에 흡연의 과거력을 가지고 있었던 환자가 75%를 차지하고 있음에도 불구하고 23예(33%)에서 p53 단백질의 발현의 검출을 보여, 본 연구에서의 21예의 폐선암중 6예(28.6%)에서 p53 단백질의 발현을 보인 것에 비해 약간 높은 검출율을 보였다. 환자군의 구성과 상관없이 p53 발현이 낮은 것은 Westra등¹의 연구에서는 조직을 Target Unmasking Fluid로 전처리하여 단백질의 검출을 증가시키는 과정을 거쳤지만, 본 연구에서는 이 방법을 실시하지 아니함으로써 생긴 차이가 아닐까 생각한다. 또 종양조직을 오븐에서 고주파 전자파(microwave)로 가열한 경우에 p53 단백질의 발현 검출율이 높다는 연구 결과가 있으므로^{29,30} 본 연구에서도 이러한 전처리를 하였다면 좀더 높은 p53 단백질의 발현을 관찰할 수 있었으리라 생각된다. 어떤 종양에서는 p53 단백질의 축적은 없지만 실제로는 유전자의 변화가 일어나 변이형의 p53을 가지고 있는 경우도 있는데¹⁷ 이러한 현상은 변이 유전자내에 stop codon이 존재하여 전사가 일어나지 않아 단백질 합성이 되지않음으로 면역조직화학적 염색으로는 p53 단백질이 검출이 되지 않기 때문이다³¹. 그러므로 면역조직화학적 염색에 의한 p53 단백질의 발현율의 검사는 과소 평가되어지는 경우는 있으나 과대 평가되어지는 경우는 거의 없다고 생각된다. 본 연구에서는 p53 유전자 자체의 변화에 대한 연구는 시행되

지 아니하였으므로 실제적으로는 유전자 변화가 있으면서도 변이 p53 단백질 발현이 일어나지 아니한 것인지 또 이형접합체의 소실로 인해 p53 단백질이 전혀 없는 것인지는 알 수가 없다.

본 연구에서 조사한 59명의 대상군에서 35예의 편평상피암 중 21예(60.0%), 21예의 선암 중 6예(28.6%), 1예의 소세포암 중 1예(100%)에서, 그리고 1예의 미분화성 대세포암과 1예의 편평상피선암에서 0예(0%)가 p53 면역 염색에서 양성을 보여 조직학적 분류와 p53 단백질의 발현사이에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보였다($p=0.01$)(Table 2). 본 연구에서 21예의 선암중 4예의 세기관지폐포암도 있었으나 1예(25%)가 p53 면역 염색에서 양성을 보여 선암의 경우와 별 차이가 없으며 예수가 적어서 선암에 포함하여 평가하였다. 이러한 결과는 p53 단백질의 발현이 편평상피암과 선암에서 높은 비율로 검출되고 이중에서도 특히 편평상피암에서 비교적 높게 검출됨을 보고한 이전의 여러 연구들의 결과와 일치하였다^{4,5,25}. 이렇게 편평상피암에서 높은 p53 단백질의 검출을 보이는 이유는 정상 호흡기상피의 편평세포화생이 선암에 비해 2배이상 많이 발생하며 편평상피암에서는 이 편평세포화생이 암의 전구 단계임을 연구한 보고가 있고³² 이러한 편평세포화생이 흡연과 밀접한 관련이 있다는 연구³³와 연관지어 볼 때 흡연에 의한 정상 호흡기 상피의 편평화생이 편평상피암에서의 높은 p53 단백질 발현빈도와 관계가 있으리라 생각된다. 소세포암의 경우 여러 연구들^{4,6}에서 비소세포암에 비해 높은 빈도의 p53 검출을 보고하고 있으나 본 연구에서는 단지 1예만을 대상으로 하여 적절한 비교가 되지 않는다 하겠다.

Westra등¹의 연구에 의하면 선암의 경우 p53 단백질 발현이 양성인 23예 중 분화도가 좋은 경우가 3예(13%), 중등도의 분화도를 보인 경우가 12예(52%), 그리고 나쁜 분화도를 보인 경우가 8예(35%)로 조직학적 분화도와 p53 단백질의 발현빈도 사이에 연관 관계가 있음을 보고하였으나, 여러 연구들에서 서로 다른 연구 결과를 보여 아직까지 확실히 규명되어지지 않고 있다¹². 본 연구에서는 편평세포암과 선암 모두에서 종양의 조직학적 분화도에 따른 p53 단백질의 발현 빈도는 의미있는 차이를 보이지 않았다(Table 3, 4).

종양의 분화도와 p53 단백질 발현과의 연관성 그리고 예후 추정인자로서의 p53 단백질의 가치를 평가하였던 Brambilla등²⁵의 연구에서 p53 단백질의 발현이 폐암의 초기 단계인 병기 I기, II기에서는 39%,

진행된 단계인 병기 III기, IV기에서는 74%로 병기가 진행될수록 p53 발현율이 높아 이들 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보고하였으나, 본 연구에서는 병기 I기, II기에서는 47%, 병기 III기, IV기에서는 45%에서 p53 단백질 발현을 보여 두 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.(Table 5). 하지만 본 연구에서 병기 I의 폐암 초기에도 p53 단백질의 발현을 관찰할 수 있었으므로 p53 단백질 발현이 진행된 병기에만 나타나는 것이 아님을 알 수 있어 기관지 점막상피의 편평세포화생이나 이형성증이 있는 경우 등 점막상피의 이상 증식을 보이는 경우에 p53 단백질을 면역조직화학적 염색방법으로 검사하면 폐암의 조기 진단에 도움이 될 것으로 사료된다.

최근에 담배에 유전자 변이를 유발하는 능력을 가진 특정 발암물질이 p53 유전자에 작용한다는 가설을 뒷받침하는 여러 연구들이 보고되고 있다¹². 본 연구에서 흡연의 과거력이 없는 경우에는 5.6%의 매우 낮은 빈도로 p53 단백질의 발현을 보인 반면, 이전에 흡연의 과거력을 가진 환자에서 46.2%, 수술당시까지도 흡연을 하였던 환자에서는 75%의 높은 빈도로 p53 단백질의 발현을 보여서 흡연과 p53 단백질의 발현사이에 통계적으로 유의한 상관 관계가 있음을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과는 흡연의 과거력이 없는 경우에는 0%, 이전에 흡연의 과거력을 가진 환자에서 33%, 그리고 수술 당시까지도 흡연을 하였던 폐 선암 환자에서는 56%에서 p53 단백질의 발현을 보고한 Westra등¹의 연구 결과와 유사하였다. 따라서 흡연은 p53 단백질 발현과 상당한 연관 관계가 있는 것으로 여겨지나 아직까지 완전히 규명된 것은 아니다. 최근의 연구에 의하면¹⁸ 담배내의 주요한 구성 성분인 benzopyrene 이라는 발암 물질이 기도의 점막세포에 침착되면 이 물질이 대사 활성화에 의하여 여러가지의 이소체가 형성되는데, 이것이 DNA염기의 구아닌의 exocyclic N-2 amino group과 결합하여 구아닌에서 티미딘으로의 변위를 일으켜 변이형 p53 유전자를 형성한다고 설명하고 있다. 본 연구에서 p53 단백질의 발현이 pack years(packs of cigarettes per day x year smoked)와도 밀접한 연관이 있음을 보여 주었다(Fig. 2). Westra등¹의 연구에서는 담배를 끊은 기간과 p53 단백질의 발현사이에 연관 관계가 없다고 보고하고 있는데, 본 연구에서는 담배를 끊은 정확한 시기나 기간에 대한 임상자료를 얻지 못하여 금연시기와 p53 단백질 발현과의 관계에 대한 평가는 할 수 없었다.

결 론

1990년 3월부터 1994년 6월까지 동아대학교 병원에서 원발성 폐암으로 진단받고 편측 폐절제술이나 폐엽절제술을 시행받은 59예를 대상으로 단클론의 항 p53 단백질 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색으로 p53 단백질 발현 양상을 관찰하였다. 폐암의 조직학적 형태, 조직학적 분화도, 병기 그리고 흡연과 p53 발현 양상과의 상관 관계를 살펴본 결과 다음과 같은 소견을 얻었다.

1) 전체 59예의 폐암 조직 중 28예(47.5%)에서 p53 단백질 발현이 관찰되었다. 35예의 편평상피암 중 21예(60.0%), 21예의 선암 중에서는 6예(28.6%), 1예의 소세포암 중 1예에서 p53 단백질 발현을 보였고, 각각 1예의 미분화성 대세포암과 편평상 피선암에서는 p53 단백질 발현이 보이지 않았다. 폐암, 특히 편평세포암과 선암에서 조직학적 형태와 p53 단백질 발현 빈도에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

2) 폐암의 조직학적 분화도에 따른 p53 단백질의 발현율은 편평상피암과 선암에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

3) 폐암의 병기에 따른 p53 단백질 발현은 초기군인 32예의 병기 I기, II기 중 15예(47%)에서, 진행군인 27예의 병기 III기, IV기 중 13예(45%)에서 나타났으며, 두 군 사이에 p53 단백질의 발현율은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

4) 폐암 진단을 받기 이전에 금연한 13예 중 6예(46.15%)에서 그리고 진단 받을 당시 까지 흡연을 하였던 28예 중 21예(75%)에서 p53 단백질의 발현을 볼 수 있었고, 흡연의 과거력이 없었던 18예 중에서는 1예(5.56%)에서만 p53 단백질의 발현을 볼 수 있어 흡연과 p53 단백질 발현과는 통계적으로 유의한 상관 관계가 있음을 나타내었다. 그리고 pack years와 p53 단백질 발현 빈도와도 밀접한 상관 관계가 있어 흡연량과 흡연기간이 길수록 p53 단백질 발현율이 높았다.

이상의 결과는 폐암발생의 한 원인 인자로 알려진 흡연이 종양억제유전자인 p53을 암유전자인 p53 변이형으로 변화시키는데 중요한 역할을 하고, 변이 p53 단백질의 발현이 폐암의 발생기전에 관여하고 있음을 시사하는 소견을 제시하였다.

참 고 문 헌

1. Westra WH, Offerhaus JG, Goodman SN, et al. Over-

expression of the p53 tumor suppressor gene product in lung adenocarcinoma is associated with cigarette smoking. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 213-20.

2. Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, et al. p53 mutation in non-small cell cancer in Japan: Association between mutation and smoking. *Cancer Res* 1992; 52: 734-6.
3. Minna JD, Battey JF, Brooks BJ, et al. Molecular genetic analysis reveals chromosomal deletion, gene amplification, and autocrine growth factor production in the pathogenesis of human lung cancer. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986; 51: 843-53.
4. Iggo R, Gaster K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335: 675-9.
5. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, et al. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1990; 5: 1603-10.
6. Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R. The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* 1991; 6: 1775-8.
7. Lane DP, Crawford LV. T-antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-3.
8. Isobe M, Emanuel B, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. *Nature* 1986; 320: 84-5.
9. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. *Science* 1989; 244: 217-21.
10. Frank TS, Bartos RE, Haefner HK, Robert JA, Wilson MD, Hubbell GP. Loss of heterozygosity and overexpression of the p53 gene in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 1994; 7: 3-10.
11. Rodrigues NR, Rowan A, Smith MEF, et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7555-9.
12. Soares P, Teijeiro JC, Simoes MS. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology* 1994; 24: 205-10.
13. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1109-14.
14. Yu CCW, Wilkinson N, Brito MJ, Buckley CH, Fox H, Levison DA. Patterns of immunohistochemical

- staining cell nuclear antigen and p53 in benign and neoplastic human endometrium. *Histopathology* 1993; 23: 367-71.
15. Paquette RL, Lee YY, Wilkzinsky SP, et al. Mutations of p53 and human papilloma virus infection in cervical carcinoma. *Cancer* 1993; 72: 1272-80.
 16. Kallakury VS, Figge J, Ross JS, Fisher HA, Figge HL, Jennings TA. Association of p53 immunoreactivity with high gleason tumor grade in prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994; 25: 92-7.
 17. Bennett WP, Hollstein MC, He A, et al. Archival analysis of p53 genetic and protein alterations in Chinese oesophageal cancer. *Oncogene* 1991; 6: 1779-84.
 18. Carothers AM, Grunberger D. DNA base changes in benzopyrene diol epoxide induced dihydrofolate reductase mutants of Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 1990; 11: 189-92.
 19. Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi S, Hayashi K, Sekiya T. Aberration of the p53 tumor suppressor gene in the human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 1992; 52: 4799-804.
 20. Benchimol S, Pim D, Crawford L. Radioimmunoassay of the cellular protein p53 in mouse and human cell lines. *Embo J* 1982; 1: 1055-62.
 21. Rogel A, Poplike M, Webb CO, Oren M. p53 cellular tumor antigen; analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos and tumors. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 2852-5.
 22. American Joint Committee on Cancer. Manual for staging of cancer, 4th ed. Chicago. *AJCC* 1992; 195-200.
 23. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, et al. Identification of p53 as a sequence specific DNA-binding protein. *Science* 1991; 52: 1708-11.
 24. Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53 regulated gene expression. *Science* 1992; 256: 827-30.
 25. Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, et al. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143: 199-210.
 26. Bennett WP, Colby TV, Travis WP, et al. p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res* 1993; 53: 4817-22.
 27. Bodner SM, Minna JD, Jensen SM. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene* 1992; 7: 743-9.
 28. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6: 1699-703.
 29. Igarashi H, Sugimura H, Maruyama K, et al. Alteration of immunoreactivity by hydrated autoclaving, microwave treatment, and simple heating of paraffin-embedded tissue sections. *APMIS* 1994; 102: 295-307.
 30. Terata T, Shimizu K, Izumi R, Nakanuma Y. p53 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded archival specimens of intrahepatic cholangiocarcinoma: retrieval of p53 antigenicity by microwave oven heating of tissue sections. *Mod Pathol* 1994; 7: 249-52.
 31. Vahakangas KH, Samet JM, Metcalf RA, et al. Mutations of p53 and ras genes in radon-associated lung cancer from uranium miners. *Lancet* 1992; 339: 576-80.
 32. Klein N, Vignaud JM, Sadmi M, et al. Squamous metaplasia expression of protooncogenes and p53 in lung cancer patients. *Lab Invest* 1993; 68: 26-32.
 33. Lu B. Squamous metaplasia of the mucosa of the human laryngeal ventricle: a clinicopathological study with reference to the possibility of de novo carcinogenesis. *Nippon Jibiniinkoka Gakkai Kaiho* 1992; 95: 360-75.
-